

高效液相色谱-串联质谱联用法与高效液相色谱法同步测定白玉菇麦角固醇和VD₂方法比较

徐明芳¹, 沈林燕¹, 杨云舒², 傅利军², 孙 勇^{2,*}, 王洋洋¹, 彭 璐¹, 黄晓晶¹, 李 彦¹

(1.暨南大学生命科学技术学院, 广东 广州 510632; 2.北京食品科学研究院, 北京 100068)

摘要: 建立高效液相色谱-串联质谱 (high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS) 联用法与HPLC法同步检测白玉菇样品中麦角固醇和VD₂含量方法, 经方法学评价确定两种检测方法的线性范围、灵敏度与精确性。通过对经醇碱皂化回流法提取样品中麦角固醇和VD₂的分析验证, 阐述两种检测方法的差异性, 为白玉菇有效生物活性成分与相关产品的质量检测和对白玉菇中麦角固醇与VD₂之间转化关系的研究提供技术支持。HPLC-MS/MS法中, 采用色谱分离柱Agilent SB-C₈ Rapid Res柱 (2.1 mm×50 mm, 3.5 μm) 及在优化的色谱条件下, 麦角固醇与VD₂之间色谱峰保留时间分别为4.303 min和4.22 min。电喷雾离子源正离子模式下采用多反应选择离子监测模式, 分别选择 m/z 379.3/125.3与 m/z 397.3/125.3离子对麦角固醇与VD₂进行定量, 结果表明麦角固醇在0.15~6 mg/L、VD₂在0.01~1 mg/L范围内与峰面积线性关系良好, 平均加标回收率分别为93.51%、90.56%, 日内和日间相对标准偏差均小于7%。HPLC法采用COSMOSIL Column 5C₁₈-MS-II (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 柱分离体系, 麦角固醇和VD₂色谱峰保留时间分别为12.891 min和9.919 min, 方法学评价结果显示, 麦角固醇在15~750 mg/L、VD₂在0.5~50 mg/L范围内与峰面积线性关系良好, 两者的平均回收率分别为98.51%、94.05%, 日内和日间相对标准偏差均小于1%。采集的样品采用HPLC-MS/MS联用法和HPLC法分别检测实验结果有一定的差异, 与HPLC法相比, HPLC-MS/MS联用法具有快速检测时间短、检出限低、更灵敏的优势。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 联用法; 高效液相色谱 (HPLC) 法; 麦角固醇; VD₂; 同步检测; 白玉菇

Comparison of HPLC-MS/MS and HPLC for the Synchronous Determination of Ergosterol and VD₂ in White *Hypsizygus marmoreus*

XU Mingfang¹, SHEN Linyan¹, YANG Yunshu², FU Lijun², SUN Yong^{2,*}, WANG Yangyang¹, PENG Lu¹, HUANG Xiaojing¹, LI Yan¹

(1. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Beijing Academy of Food Science, Beijing 100068, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method and a high performance liquid chromatography (HPLC) method were established to simultaneously detect the contents of ergosterol and VD₂ in white *Hypsizygus marmoreus* and methodological evaluation was performed to determine the linearity range, sensitivity and accuracy of the two detection methods under optimized detection parameters. The differences between the two detection methods in qualitative and quantitative analysis of ergosterol and VD₂ extracted from samples by alcohol-alkali saponification reflux method were verified in order to provide technical support for the detection of effective bioactive components and the study of the conversion between ergosterol and VD₂ in white *H. marmoreus*. In the HPLC-MS/MS method, the chromatographic peak retention times of ergosterol and VD₂ were 4.303 min and 4.22 min, respectively, under optimized chromatographic conditions using Agilent SB-C₈ Rapid Res column (2.1 mm×50 mm, 3.5 μm) as the separation column. Ergosterol and VD₂ were quantified by selecting m/z 379.3/125.3 and 397.3/125.3 as ion pairs under the multi-reaction monitoring (MRM) mode using an electrospray ionization (ESI) source operating in the positive ion mode. The results

收稿日期: 2018-11-12

基金项目: 广东省科技计划项目(2015A010107006); “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFD0400202)

第一作者简介: 徐明芳(1962—)(ORCID: 0000-0003-1021-2632), 女, 教授, 博士, 主要从事食品特性鉴定与分离技术、生物反应器工程研究。E-mail: xumingfang@jnu.edu.cn

*通信作者简介: 孙勇(1977—)(ORCID: 0000-0001-8360-5432), 男, 副研究员, 博士, 主要从事食品营养化学研究。

E-mail: sy183509@163.com

showed that the concentration and peak area presented a good linear relationship for ergosterol and VD₂ in the range of 0.15–6 mg/L and 0.01–1 mg/L, respectively. The average recoveries of ergosterol and VD₂ from spiked samples were 93.51% and 90.56%, respectively, and the relative standard deviations (RSDs) of intra-day and inter-day differences were both less than 7%. In the HPLC method, the peak retention times of ergosterol and VD₂ were 12.891 min and 9.919 min, respectively, under optimized separation conditions on a COSMOSIL 5C₁₈-MS-II column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The methodology evaluation results of HPLC showed a good linear relationship between concentration and peak area for ergosterol and VD₂ in the range of 15–750 and 0.5–50 mg/L, respectively. The average recoveries of ergosterol and VD₂ from spiked samples were 98.51% and 94.05%, respectively, and the RSDs of intraday and inter-day differences were lower than 1%. Some differences existed between the two methods. Compared with HPLC, the HPLC-MS/MS method established in this research exhibited the advantages of short detection time, low detection limit and high sensitivity.

Keywords: liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); high performance liquid chromatography (HPLC); ergosterol; VD₂; synchronous detection; white *Hypsizygus marmoreus*

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181112-126

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 12-0237-08

引文格式:

徐明芳, 沈林燕, 杨云舒, 等. 高效液相色谱-串联质谱联用法与高效液相色谱法同步测定白玉菇麦角固醇和VD₂方法比较[J]. 食品科学, 2019, 40(12): 237-244. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181112-126. <http://www.spkx.net.cn>

XU Mingfang, SHEN Linyan, YANG Yunshu, et al. Comparison of HPLC-MS/MS and HPLC for the synchronous determination of ergosterol and VD₂ in white *Hypsizygus marmoreus*[J]. Food Science, 2019, 40(12): 237-244. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181112-126. <http://www.spkx.net.cn>

白玉菇又称白玉蕈、白色真姬菇 (white *Hypsizygus marmoreus*) , 是真姬菇 (*H. marmoreus*) 的一个白色变种, 隶属担子菌亚门 (Basidiomycotina) , 层菌纲 (Hymenomycetes) , 伞菌目 (Agaicales) , 白蘑科 (Tricholomataceae) , 玉蕈属 (*Hypsizygus*) , 菇体洁白清亮, 质地紧密脆嫩, 口感滑腻鲜美, 是一种深受全世界消费者喜爱的上乘山珍, 享有食用菌中的“金枝玉叶”的美称^[1]。麦角固醇 (又称麦角甾醇) 是白玉菇中重要的生物活性物质, 其化学名称为24β-甲基胆固醇-5,7烯-3β-羟基 (图1A) , 具有与膜结合酶的活性, 对确保膜结构的完整性、流动性、细胞活力、物质运输等方面起着重要作用, 还是一种重要的化工原料, 可用于“可的松”、“黄体酮”等药物的生产^[2]。

研究^[3-5]发现麦角固醇对肿瘤细胞的生长具有显著的抑制作用, 可作为有效的抗癌物质。此外, 麦角固醇还是VD₂的前体化合物, 在受到紫外光照射时, 分子中一个碳环发生断裂, 转化为VD₂^[6-8]。VD₂又称麦角钙化甾醇, 化学名称为9,10-开环麦角甾-5,7,10(19),22-四烯-3β-醇, 化学结构式如图1B所示, 是麦角固醇的同分异构体, 能调控钙、磷代谢和骨稳态, 促进孕妇和老年人对钙磷的吸收^[9-11], 影响细胞的增殖分化^[12-13], 对调节生命代谢功能有重要作用。

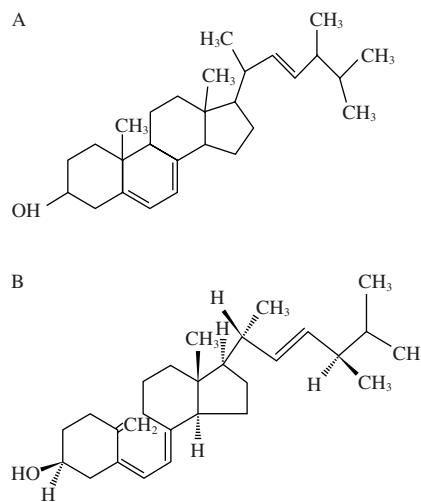


图1 麦角固醇 (A) 和VD₂ (B) 结构式
Fig. 1 Chemical structures of ergosterol (A) and VD₂ (B)

麦角固醇的检测方法主要有紫外分光光度法^[14-16]、薄层色谱扫描法^[17-18]、高效液相色谱-串联质谱 (high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)^[19-21]法和气相色谱法^[22-23]等, VD₂常采用HPLC法^[24-26]。文献报道的方法均为麦角固醇或VD₂单一组分的测定, 如研究者^[27-29]分别用HPLC和气相色谱法分析栽培蘑菇中VD₂和麦角固醇的含量, 发现栽培蘑菇中都含有丰富的麦角固醇, 却几乎没有VD₂。麦角固醇和VD₂之间特殊的光转化关系导致食用菌中两者

的含量存在动态变化，建立同步定量检测麦角固醇和VD₂的分析方法对白玉菇中有效成分的质量控制及食用菌相关新产品的研发具有重要的意义。基于HPLC-MS/MS高效分离能力、高分辨率和高灵敏度技术优势^[30-31]，本研究通过两种方法中检测条件的优化与方法学评价，旨在建立HPLC-MS/MS法快速准确同步检测白玉菇中麦角固醇与VD₂的检测方法，为食用菌新产品研发与质量标准完善提供理论依据与技术方法，对于开展同分异构体的同步检测具有重要现实意义与理论价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜白玉菇（市售），经干燥、研磨成粉末状后备用；麦角固醇、VD₂标准品（纯度>98%） 美国Sigma公司；氢氧化钠、无水乙醇、石油醚（均为分析纯） 广州化学试剂厂；甲醇（色谱纯） 天津市科密欧化学试剂有限公司；超纯水（18.2 MΩ/cm） 美国Thermo Scientific公司。

1.2 仪器与设备

ABI4000 Q TRAP型HPLC-MS/MS联用仪 美国应用生物系统公司；1100 HPLC仪（配二极管阵列检测器及数据分析平台） 美国Agilent公司；超纯水仪 美国Thermo Scientific公司；烘箱 上海福玛实验设备有限公司；旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂；SHZ-D (III) 循环水式真空泵 巩义市予华仪器有限责任公司；CP224C电子天平 奥豪斯仪器有限公司；电热恒温水浴锅 上海一恒科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 两种方法检测条件

HPLC-MS/MS联用法：电喷雾离子源正离子检测方式下采用多反应选择离子监测（multi-reaction monitoring, MRM）模式进行二级质谱分析。色谱柱：Agilent SB-C₈ Rapid Res长柱（2.1 mm×100 mm, 3.5 μm）和Agilent SB-C₈ Rapid Res短柱（2.1 mm×50 mm, 3.5 μm）；流速：500 μL/min（50 mm C₈）、250 μL/min（100 mm C₈）；流动相：100%甲醇；柱温：22 ℃；进样量：5 μL/min；离子源参数：雾化气压力310.3 kPa，辅助气压力413.7 kPa；气帘气压力137.9 kPa；离子源温度500 ℃，离子源喷雾流速5 L/min。

HPLC法：COSMOSIL Column 5C₁₈-MS-II（4.6 mm×250 mm, 5 μm）；柱温30 ℃；流动相100%

甲醇；流速1 mL/min；检测波长270 nm；进样量10 μL；运行时间15 min。

1.3.2 标准曲线的绘制

精密称取麦角固醇标准品30.00 mg, VD₂标准品10.00 mg，分别置于10 mL容量瓶中，加入无水乙醇溶解并定容、摇匀，即得麦角固醇质量浓度为3 mg/mL、VD₂质量浓度为1 mg/mL的标准品储备母液。将母液用无水乙醇依次稀释配制成HPLC-MS/MS联用法和HPLC法所需质量浓度的混合标准溶液。以麦角固醇及VD₂标准品质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

1.3.3 供试品溶液的制备

取市售鲜白玉菇子实体适量，烘干，研碎，取1 g干粉置于磨口烧瓶，加40 g/L的NaOH溶液25 mL，再加入50 mL无水乙醇，在85 ℃水浴中皂化回流90 min。皂化完毕，滤纸过滤皂化液，冷却至室温，加25 mL石油醚，充分振荡15 min，静置分层。上层无色萃取液用旋转蒸发仪45 ℃时蒸去石油醚，蒸干后样品用无水乙醇定容到10 mL容量瓶，供试品溶液测定前用0.45 μm微孔滤膜过滤。

1.3.4 样品中麦角固醇、VD₂含量的计算

$$\text{麦角固醇含量/ (mg/g)} = \frac{C_1 \times V_1 \times N_1}{W_1} \quad (1)$$

$$\text{VD}_2 \text{含量/ (\mu g/g)} = \frac{C_2 \times V_2 \times N_2}{W_2} \quad (2)$$

式中：C₁、C₂分别为麦角固醇、VD₂质量浓度；V₁、V₂分别为麦角固醇、VD₂的定容体积；N₁、N₂分别为麦角固醇、VD₂的稀释倍数；W₁、W₂分别为麦角固醇、VD₂萃取时样品的干质量。

1.4 统计分析

采用SPSS 19软件进行数据统计分析，采用Excel软件进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 HPLC-MS/MS联用法检测条件的优化

2.1.1 色谱柱的选择

不同色谱柱柱长可能会影响混合物组分的分离效果和分离时间^[32]，研究Agilent SB-C₈ Rapid Res长柱（2.1 mm×100 mm, 3.5 μm）和Agilent SB-C₈ Rapid Res短柱（2.1 mm×50 mm, 3.5 μm）对白玉菇样品中麦角固醇和VD₂的分离情况，结果如图2、3所示。比较样品MRM色谱图发现，C₈短柱与C₈长柱均能获得良好的分离度和色谱峰形，色谱峰窄且尖锐，C₈短柱的响应信号较C₈长柱稍弱，但与长柱相比，仅需4.5 min左右即可

实现对两种组分的快速分离，基于此，后续实验选用50 mm C₈柱进行同步检测。

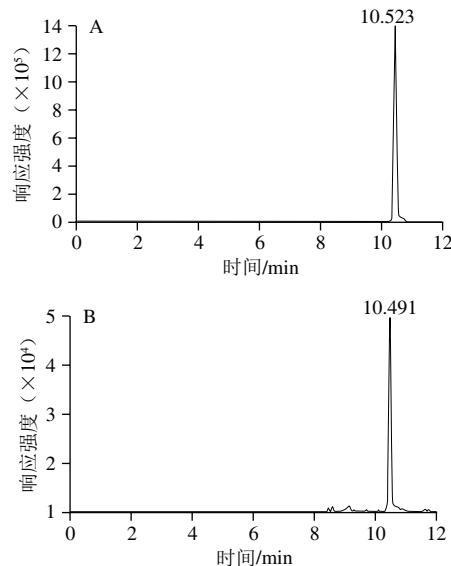


图2 100 mm C₈柱中麦角固醇(A)和VD₂(B)的分离MRM色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of ergosterol (A) and VD₂ (B) on 100 mm long C₈ column

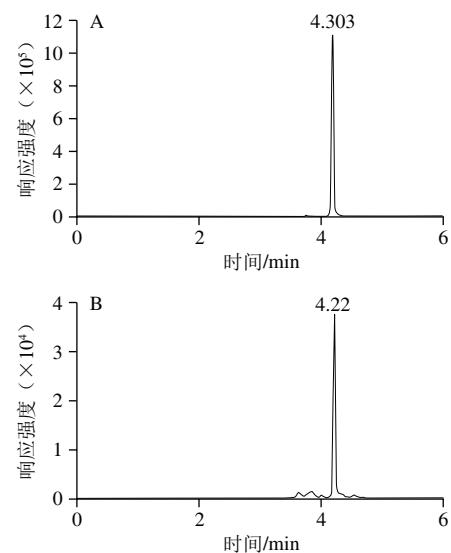


图3 50 mm C₈柱中麦角固醇(A)和VD₂(B)的分离MRM色谱图

Fig. 3 MRM chromatograms of ergosterol (A) and VD₂ (B) on 50 mm long C₈ column

2.1.2 质谱分析参数优化

采用电喷雾离子源正离子模式对麦角固醇和VD₂标准品进行全波扫描，确定麦角固醇和VD₂母离子参数，调整气帘气电压、雾化气流速、辅助气压力、离子源温度等参数，降低噪音，提高母离子稳定性和响应信号，优化锥孔电压、碰撞电压、摄入电压及碰撞室射出电压等参数（表1），MRM模式下进行质谱分析。

表1 麦角固醇及VD₂的质谱分析参数

Table 1 Mass spectrometric parameters of ergosterol and VD₂

参数	VD ₂	麦角固醇
锥孔电压/V	80	40
摄入电压/V	10	10
碰撞电压/V	18	22
碰撞室射出电压/V	6	8
离子的驻留时间/ms	200	200

在一级质谱图中从特征母离子中选择适宜的子离子，根据MRM模式下进行二级质谱分析，使母离子的响应信号降低，子离子的响应信号增强，结果如图4、5所示。

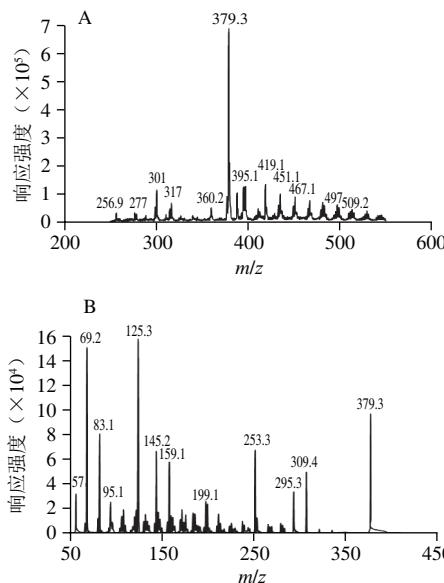


图4 麦角固醇的一级(A)、二级(B)质谱子离子扫描图

Fig. 4 Mass spectrum (A) and tandem mass spectrum (B) of ergosterol

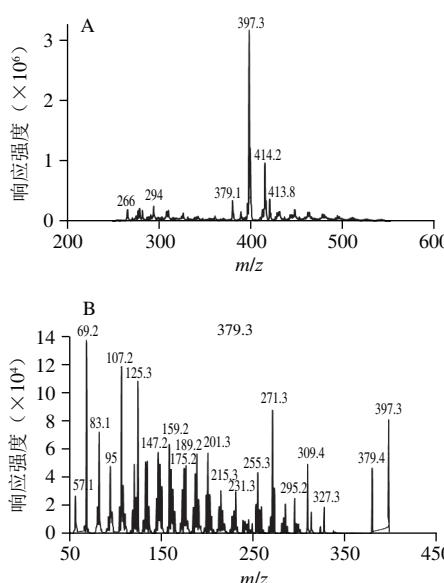
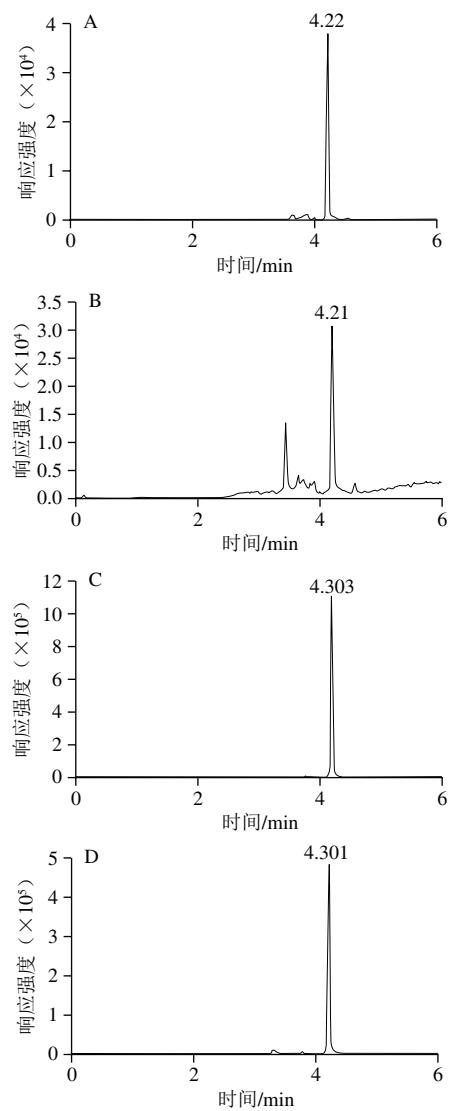


图5 VD₂的一级(A)、二级(B)质谱子离子扫描图

Fig. 5 Mass spectrum (A) and tandem mass spectrum (B) of VD₂

2.1.3 定量离子对的选择



A. $\text{VD}_2 \text{ } m/z \text{ } 397.3/125.3$; B. $\text{VD}_2 \text{ } m/z \text{ } 397.3/271.3$; C. 麦角固醇 $m/z \text{ } 379.3/125.3$; D. 麦角固醇 $m/z \text{ } 379.3/253.3$ 。

图6 不同离子对 VD_2 和麦角固醇的分离MRM色谱图

Fig. 6 MRM chromatograms of VD_2 and ergosterol with different ion pairs

麦角固醇与 VD_2 分子结构中多为烷烃和烯烃的组合(图1), 轰击产生的离子碎片较多, 且难发现明显的特征离子对。麦角固醇与 VD_2 在 MS^1+ 扫描中主要生成 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 准分子离子峰 $m/z \text{ } 379.3$ (图4A)与397.3(图5A), 对两者进行 MS^2+ 扫描, 生成信号较高的主要碎片离子, 如麦角固醇二级特征离子 m/z 为125.3、253.3(图4B)、 VD_2 的二级特征离子 m/z 125.3、271.3(图5B)。实验表明, 如果选用 $m/z \text{ } 69.2$ 、107.2等低质量端的离子容易产生干扰, 通常选择丰度较高且干扰小的离子作为特征离子, 两种物质二级质谱图中含有相同的特征离子 $m/z \text{ } 125.3$, 推测为同一烯烃碎片离子 $\text{C}_9\text{H}_{17}^+$, 可作为同步检测麦角固醇与 VD_2 定性定量依据。

从图6可知, 选用不同离子对计算出来的麦角固醇与 VD_2 含量并无显著差异, 选用 $m/z \text{ } 397.3/271.3$ 离子对定量 VD_2 时MRM色谱图的杂峰比选用 $m/z \text{ } 397.3/125.3$ 多, 导致基线极不稳定, 选择 $m/z \text{ } 397.3/125.3$ 作为 VD_2 定量离子对, $m/z \text{ } 379.3/125.3$ 作为麦角固醇定量离子对, 通过组内、组间方差分析, 研究结果并无显著差异(表2、3)。

表2 离子对的选择对 VD_2 和麦角固醇测定结果的影响

Table 2 Effect of different ion pairs on VD_2 and ergosterol contents

离子对(m/z)	待测物含量/mg			平均值	显著性(0.05)
	1	2	3		
VD_2	397.3/125.3	0.033	0.030	0.035	0.033 不显著
	397.3/271.3	0.028	0.026	0.030	0.028
麦角固醇	379.3/125.3	2.015	2.180	2.224	2.139 不显著
	379.3/253.3	2.103	2.198	2.225	2.176

表3 方差分析结果

Table 3 Results of analysis of variance

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性(0.05)
VD_2	0.000 03	1	0.000 03	6.322 58	0.065 74	不显著
	0.000 02	4	5.166 67			
	0.000 05	5				
麦角固醇	0.001 96	1	0.001 96	0.240 94	0.649 24	不显著
	0.032 56	4	0.008 14			
	0.034 52	5				

2.2 HPLC法检测条件的优化

2.2.1 流动相流速选择

柱效是柱中流动相线性流速的函数, 不同的流速可得到不同的柱效。对于特定的色谱柱, 要获得最佳柱效需采用最佳流速。流动相流速研究结果如表4、5所示。

表4 麦角固醇/ VD_2 混合标准品在不同流动相配比下的保留时间、响应信号和峰面积

Table 4 Retention time, response signal and peak area of ergosterol/ VD_2 mixed standard solution at different mobile phase compositions

甲醇-水	保留时间/min		响应信号/mAU		峰面积	
	麦角固醇	VD_2	麦角固醇	VD_2	麦角固醇	VD_2
93:7	15.132	11.638	113.667	8.891	2 915.24	202.056
97:3	13.716	10.506	119.194	9.811	2 904.21	196.256
100:0	12.891	9.919	126.126	10.456	2 925.08	210.906

由表4可知, 随着甲醇比例的增加, 保留时间随之缩短, 信号响应值随之增加, 峰面积基本接近, 选用100%甲醇作为流动相, 保留时间短, 响应信号值高, 分离效果较好。

表5 麦角固醇/ VD_2 混合标准品在不同流速下的保留时间、响应信号和峰面积

Table 5 Retention time, response signal and peak area of the ergosterol/ VD_2 mixed standard solution at different flow rates

流速/(mL/min)	保留时间/min		响应信号/mAU		峰面积	
	麦角固醇	VD_2	麦角固醇	VD_2	麦角固醇	VD_2
0.8	16.095	12.377	131.317	11.129	3 670.68	246.655
1.0	12.891	9.919	126.126	10.456	2 925.08	210.906
1.2	10.760	8.289	121.004	10.571	2 406.12	128.202

由表5可知,流速为0.8 mL/min时,保留时间较长;流速为1.2 mL/min时,标准品的峰面积相对较低,流动相流速选取为1 mL/min时,标准品的保留时间和峰面积适中。

2.2.2 柱温的选择

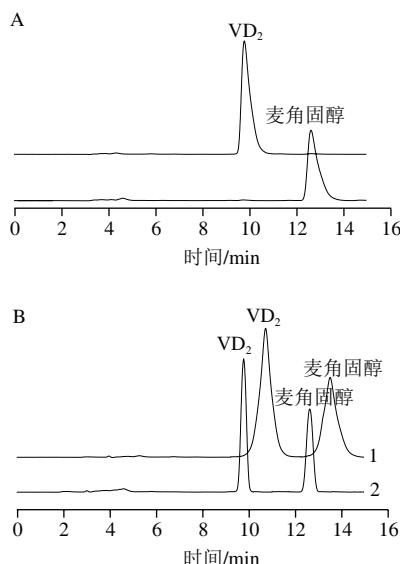
表6 麦角固醇/VD₂混合标准品在不同柱温下的保留时间、响应信号和峰面积

Table 6 Retention time, response signal and peak area of the ergosterol/VD₂ mixed standard solution at different column temperatures

柱温/℃	保留时间/min		响应信号/mAU		峰面积	
	麦角固醇	VD ₂	麦角固醇	VD ₂	麦角固醇	VD ₂
25	13.542	10.241	117.870	10.443	2 915.34	205.347
30	12.891	9.919	126.126	10.456	2 925.08	210.906
35	12.396	9.687	134.713	11.421	2 864.84	208.492

从表6可知,随着柱温的升高,麦角固醇和VD₂的保留时间与响应信号略有变化,柱温选择30 ℃时麦角固醇和VD₂的峰面积较高。

HPLC条件优化为波长270 nm、100%甲醇、柱温30 ℃、流速1 mL/min、进样量10 μL时,麦角固醇和VD₂单标与混标保留时间都如图7所示,色谱基线平稳,峰形尖锐对称,主峰与其他色谱峰实现较好分离,所有样品在15 min内检测完毕。



1.条件优化前; 2.条件优化后。

图7 麦角固醇、VD₂单标(A)和混合标准溶液(B)HPLC谱图

Fig. 7 HPLC chromatograms of VD₂, ergosterol standards (A) and mixed standard (B)

2.3 两种同步检测方法学的评价

2.3.1 线性方程、检出限与定量限

一定范围浓度的麦角固醇和VD₂标准溶液采用优化检测条件下建立的HPLC-MS/MS联用法及HPLC法进行测定,并进行线性回归,按3倍信噪比和10倍信噪比计算方法分别确定检出限和定量限,参数与结果见表7。

表7 HPLC-MS/MS及HPLC方法的线性回归参数

Table 7 Overview of the linearity data obtained by HPLC-MS/MS and HPLC

标准品	回归参数	HPLC-MS/MS	HPLC
		回归方程 $y = 702x + 4.64 \times 10^4$	$y = 8.5455x - 45.124$
麦角 固醇	相关系数 (R^2)	0.9947	0.9997
	线性范围/(mg/L)	0.15~6	15~750
	检出限/(μg/L)	1.330	1.983
	定量限/(μg/L)	4.389	6.544
	目标物保留时间/min	4.303	12.891
VD ₂	回归方程 $y = 889x + 4.56 \times 10^4$	$y = 19.441x + 0.0897$	
	相关系数 (R^2)	0.9935	0.9997
	线性范围/(mg/L)	0.01~1	0.5~50
	检出限/(μg/L)	0.061	0.1480
	定量限/(μg/L)	0.201	0.488
	目标物保留时间/min	4.220	9.919

如表7所示,HPLC-MS/MS联用法中,在质量浓度0.15~6 mg/L与0.01~1 mg/L范围内,标准品麦角固醇与VD₂浓度均与峰面积呈现良好的线性关系;HPLC法中,标准品麦角固醇质量浓度在15~750 mg/L与VD₂质量浓度在0.5~50 mg/L范围内,均与峰面积呈现良好的线性关系。与HPLC法相比,HPLC-MS/MS联用法检出限、定量限与检测时间均低于HPLC法。

2.3.2 重复性评价

同一混标样品取3份精密称定1 g,制备样品溶液。用两种检测方法分别测定VD₂和麦角固醇含量,记录峰面积积分值,按照各自的标准方程计算含量及其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值,结果如表8所示,数据表明两种检测方法具有良好的重复性,但对于低浓度的VD₂检测,HPLC法缺乏有效性。

表8 HPLC-MS/MS及HPLC方法的重复性实验结果

Table 8 Results of repeatability obtained by HPLC-MS/MS and HPLC

检测方法	样品溶液 重复进样	麦角固醇 含量/(mg/g)	VD ₂ 含量/ (mg/g)
HPLC-MS/MS	1	2.015	0.033
	2	2.180	0.030
	3	2.224	0.035
	平均值	2.139	0.033
	RSD/%	5.150	7.270
HPLC	1	4.097	—
	2	4.100	—
	3	3.955	—
	平均值	4.050	—
	RSD/%	2.050	—

注:—未检出。下同。

2.3.3 加标回收率与仪器精密度

分别精确称定1 g已知VD₂和麦角固醇含量的样品3份准确加入一定量的VD₂和麦角固醇标准品,按照样品处理方法制备样品溶液。用两种检测方法分别测定VD₂和麦角固醇含量,按外标法以峰面积计算含量,结果如表9所示。两种检测方法RSD低于均低于6%。

表9 HPLC-MS/MS的VD₂回收率实验结果 (n=3)
Table 9 Recovery of VD₂ by HPLC-MS/MS (n = 3)

方法	物质	序号	样品含量	标准品加入量	测得量	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
HPLC-MS/MS	VD ₂ /μg	1	33.00	10.00	42.00	90.00		
		2	33.00	15.00	46.00	86.67	90.56	4.63
		3	33.00	20.00	52.00	95.00		
HPLC	麦角固醇/mg	1	2.139	0.40	2.535	99.00		
		2	2.139	1.00	3.043	90.40	93.51	5.10
		3	2.139	1.70	3.688	91.12		
HPLC	VD ₂ /μg	1	—	10.00	9.376	93.76		
		2	—	20.00	18.939	94.70	94.05	0.60
		3	—	30.00	28.106	93.69		
HPLC	麦角固醇/mg	1	4.050	0.50	4.546	99.20		
		2	4.050	1.00	5.030	98.00	98.51	0.63
		3	4.050	1.50	5.525	98.33		

2.3.4 日内和日间精密度实验结果

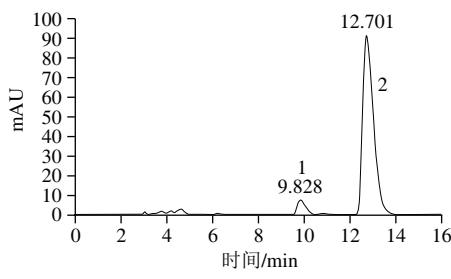
配制高中低麦角固醇和VD₂标准品溶液，每天进样3次连续测定3 d，记录麦角固醇和VD₂的峰面积积分值，计算各自峰面积的RSD计算日内和日间差异，结果如表10所示。

表10 HPLC-MS/MS及HPLC方法的日内和日间精密度实验结果
Table 10 Results of intra-day and inter-day precision obtained by HPLC-MS/MS and HPLC

检测方法	标准品质量浓度/(mg/L) (麦角固醇/VD ₂)	日内RSD%/(n=3)		日间RSD%/(n=3)	
		麦角固醇	VD ₂	麦角固醇	VD ₂
HPLC-MS/MS	0.030/0.010	0.61	6.71	2.56	4.53
	0.600/0.200	2.32	2.33	3.87	3.57
	3.000/1.000	2.50	0.54	2.50	1.67
HPLC	6.00/4.00	0.17	0.09	0.14	0.11
	3.00/1.00	0.42	0.40	0.29	0.28
	7.50/1.0	0.16	0.28	0.90	0.16

由表10可见，较高质量浓度范围内，HPLC法日内和日间精密度较高，RSD均低于1%，低质量浓度的检测HPLC-MS/MS联用法更具优势，低、中、高3个水平的麦角固醇和VD₂标准品日内和日间精密度实验结果的RSD均低于7%，表明两种方法精密度良好。

2.4 样品检测与系统适应性



1、2分别为VD₂和麦角固醇。

图8 白玉菇样品中VD₂和麦角固醇HPLC色谱图
Fig. 8 Chromatograms of VD₂ and ergosterol in white *H. marmoreus* sample

从图8可知，麦角固醇与VD₂分别在12.701 min与9.828 min出峰，峰后有少量杂峰但不影响麦角固醇与VD₂的定性与定量分析。

白玉菇样品中麦角固醇和VD₂ MRM色谱图如图9所示，供试品溶液中虽有微量的杂质峰干扰，但对样品测定无影响，建立的两种检测方法专属特异性强系统适应性好。

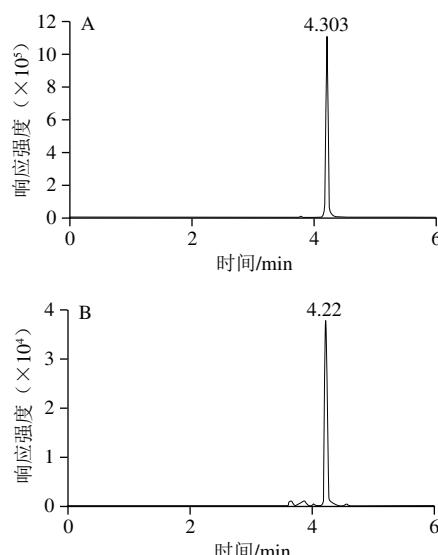


图9 白玉菇样品中麦角固醇 (A) 和VD₂ (B) MRM色谱图

Fig. 9 MRM chromatogram of ergosterol (A) and VD₂ (B) in white *H. marmoreus* sample

市售3种不同厂家的白玉菇样品采用上述两种方法测定，白玉菇中麦角固醇和VD₂的含量结果见表11。

表11 不同厂家市售白玉菇中麦角固醇和VD₂两种检测方法测定结果比较 (n=3)

Table 11 Comparison of results obtained for determination of ergosterol and VD₂ by HPLC-MS/MS and HPLC in commercially available white *H. marmoreus* from different manufacturers (n = 3)

检测方法	市售白玉菇	麦角固醇含量/(mg/g)	VD ₂ 含量/(mg/g)
HPLC-MS/MS联用	样品1	2.139±0.11	0.033±0.002
	样品2	1.732±0.05	0.019±0.003
	样品3	1.552±0.183	0.027±0.003
HPLC	样品1	4.050±0.083	—
	样品2	3.716±0.106	—
	样品3	3.516±0.094	—

注：—未检出。

市售白玉菇样品检测结果(表11)可知：HPLC-MS/MS法可以有效检测麦角固醇与微量的VD₂；HPLC法仅能测定麦角固醇含量，含量高于HPLC-MS/MS法，且无法检测出白玉菇样品中微量的VD₂含量，两种方法的检测结果存在一定的差异性，从测定原理看，HPLC-MS/MS是采用HPLC系统将物质分开后，经质谱检测系统，使各组分电离成不同m/z的离子，通过分析离子化样品的m/z实

现对被测化合物定性定量分析; HPLC是一种以液体为流动相的色谱系统, 待测样品随流动相进入装有固定相的色谱柱, 在柱内利用液-液分配或吸附作用实现待测组分的分离进入二极管阵列检测器检测, 以标准物质的HPLC色谱和保留时间定性, 峰面积定量。研究结果与测定效率表明, HPLC-MS/MS高分辨率与高灵敏度和定性定量能力, 与HPLC法相比, 具有更低的检出限, 更短的检测时间。

3 结 论

本实验建立HPLC-MS/MS与HPLC两种同步检测白玉菇样品中麦角固醇和VD₂含量方法与方法学评价, 通过对市售白玉菇样品中麦角固醇和VD₂含量进行检测与系统适应性分析, 对比两种方法检测的差异性。HPLC-MS/MS方法则具有更高分离和定性定量的能力, 在检测过程中可以锁定目标离子, 排除存在杂质的离子干扰, 灵敏度和准确度更高。两种方法都可用于麦角固醇和VD₂的同步定量测定, 在相应的线性浓度范围内, 与HPLC法相比, HPLC-MS/MS法检测麦角固醇和VD₂的线性范围、检出限和定量限更低, 分析时间更短灵敏更高, 适用于痕量物质的测定和同分异构体样品分析, 为食用菌新产品研发与质量标准完善提供理论依据与技术方法具有重要现实意义。

参考文献:

- [1] 陈成弟. 白玉菇优质高产栽培技术[J]. 北京农业, 2002, 8(6): 22. DOI:10.3969/j.issn.1000-6966.2002.08.032.
- [2] 曹龙辉, 李晓琪, 赵文红, 等. 麦角甾醇的研究进展[J]. 中国酿造, 2014, 33(4): 9-12. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2014.04.003.
- [3] YASUKAWA K, AOKI T, TAKIDO M. Inhibitory effects of ergosterol isolated from the edible mushroom *Hypsizigus marmoreus* on TPA-induced inflammatory ear oedema and tumour promotion in mice[J]. Phytotherapy Research, 1994, 8(1): 10-13. DOI:10.1002/ptr.2650080103.
- [4] SUBBIAH M T, ABPLANALP W. Ergosterol (major sterol of baker's and brewer's yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells *in vitro* and the potential role of its oxidation products[J]. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 2003, 73(1): 19-23. DOI:10.1024/0300-9831.73.1.19.
- [5] 高虹, 史德芳, 杨德, 等. 巴西菇麦角甾醇抗肿瘤活性及作用机理初探[J]. 中国食用菌, 2011, 30(6): 35-39. DOI:10.3969/j.issn.1003-8310.2011.06.012.
- [6] WON D J, KIM S Y, JANG C H, et al. Optimization of UV irradiation conditions for the vitamin D₂-fortified shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) using response surface methodology[J]. Food Science and Biotechnology, 2018, 27(2): 417-424. DOI:10.1007/s10068-017-0266-0.
- [7] SIMON R R, PHILLIPS K M, HORST R L, et al. Vitamin D mushrooms: comparison of the composition of button mushrooms (*Agaricus bisporus*) treated postharvest with UVB light or sunlight[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(16): 8724-8732. DOI:10.1021/jf201255b.
- [8] JASINGHE V J, PERERA C O. Ultraviolet irradiation: the generator of vitamin D₂ in edible mushrooms[J]. Food Chemistry, 2006, 95(4): 638-643. DOI:10.1016/j.foodchem.2005.01.046.
- [9] DELUCA H F. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites[J]. BoneKEY Reports, 2014, 3: 479. DOI:10.1038/bonekey.2013.213.
- [10] GALLAGHER J C. Vitamin D and aging[J]. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 2013, 42(2): 319-332. DOI:10.1016/j.ecl.2013.02.004.
- [11] GULSETH H L, GJELSTAD I M, BIRKELAND K I, et al. Vitamin D and the metabolic syndrome[J]. Current Vascular Pharmacology, 2013, 11(6): 968-984. DOI:10.2174/15701611113119990169.
- [12] LEYSSENS C, VERLINDEN L, VERSTUYF A. The future of vitamin D analogs[J]. Frontiers in Physiology, 2014, 5: 122. DOI:10.3389/fphys.2014.00122.
- [13] GIRGIS C M, CLIFTON-BLIGH R J, MOKBEL N, et al. Vitamin D signaling regulates proliferation, differentiation, and myotube size in C2C12 skeletal muscle cells[J]. Endocrinology, 2014, 155(2): 347-357. DOI:10.1210/en.2013-1205.
- [14] ARNEZEDER C H, KOLIANDER W, HAMPEL W A. Rapid determination of ergosterol in yeast cells[J]. Analytica Chimica Acta, 1989, 225: 129-136. DOI:10.1016/S0003-2670(00)84601-2.
- [15] 许旭萍, 李惠珍, 余晨兴, 等. 麦角固醇产生菌*Torulopsis famata*优化发酵条件的研究[J]. 生物学杂志, 2002, 18(2): 15-17. DOI:10.3969/j.issn.2095-1736.2002.02.006.
- [16] 姚广印, 张双凤, 谢宗良. 酵母细胞麦角固醇的提取条件[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2007, 27(2): 195-198. DOI:10.3969/j.issn.1000-1565.2007.02.022.
- [17] LARSEN T, AXELSEN J, RAVN H W. Simplified and rapid method for extraction of ergosterol from natural samples and detection with quantitative and semi-quantitative methods using thin-layer chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1026(1/2): 301-304. DOI:10.1016/j.chroma.2003.10.128.
- [18] 曹永兵, 姜远英, 殷明, 等. 薄层色谱扫描法检测氟康唑对真菌麦角固醇生物合成的影响[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(5): 312-315. DOI:10.3321/j.issn:0258-879X.1999.05.014.
- [19] 张萍, 肖新月, 黄玮, 等. RP-HPLC-UV法测定5种发酵虫草制剂中麦角甾醇的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2): 258-260. DOI:10.16155/j.0254-1793.2011.02.013.
- [20] 赵英永, 赵晔, 林瑞超, 等. RP-HPLC法测定猪苓中麦角甾醇的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(6): 898-900. DOI:10.16155/j.0254-1793.2009.06.009.
- [21] 汪财生, 汪乐意, 高有领, 等. 响应面法优化根霉菌产麦角固醇的液体发酵工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(5): 229-233.
- [22] PHILLIPS K M, RUGGIO D M, HORST R L, et al. Vitamin D and sterol composition of 10 types of mushrooms from retail suppliers in the United States[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(14): 7841-7853. DOI:10.1021/jf104246z.
- [23] WANG Q, CHENG J X, WANG L X, et al. Valorization of spent shiitake substrate for recovery of antitumor fungal sterols by ultrasound-assisted extraction[J]. Journal of Food Biochemistry, 2018, 42(5): e12602. DOI:10.1111/jfbc.12602.
- [24] 陈光. HPLC法测定脂溶性维生素注射液中维生素D₂及维生素E的含量[J]. 中国医药科学, 2017, 7(15): 46-50. DOI:10.3969/j.issn.2095-0616.2017.15.013.
- [25] 王程, 张济敏, 林玲. RP-HPLC法同时测定维生素AD小丸中维生素A棕榈酸酯和维生素D₂的含量[J]. 中国药品标准, 2017, 18(4): 308-311.
- [26] 曹少谦, 陈麒宇, 程亮. 脉冲强光处理对香菇中维生素D₂含量的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(19): 80-83; 301. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2018.19.014.
- [27] 李丽, 蒋景龙. 紫外光影响食用菌中VD₂含量的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(1): 273-277. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201501052.
- [28] MATTILA P H, LAMPI A M, RONKAINEN R, et al. Sterol and vitamin D₂ contents in some wild and cultivated mushrooms[J]. Food Chemistry, 2002, 76(3): 293-298. DOI:10.1016/S0308-8146(01)00275-8.
- [29] URBAIN P, JAKOBSEN J. Dose-response effect of sunlight on vitamin D₂ production in *Agaricus bisporus* mushrooms[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(37): 8156-8161. DOI:10.1021/acs.jafc.5b02945.
- [30] 余玲玲, 李兴, 陈燕丽, 等. 液质联用技术用于复杂混合物体系中小分子化合物的分析[J]. 中国科学: 化学, 2017, 47(12): 1379-1391. DOI:10.1360/N032017-00118.
- [31] TAOFIQ O, FERNANDES A, BARROS L, et al. UV-irradiated mushrooms as a source of vitamin D₂: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 70: 82-94. DOI:10.1016/j.tifs.2017.10.008.
- [32] 张养军, 王京兰, 李蕾, 等. 用反相液相色谱分离多肽时峰容量与色谱柱长度关系的研究[J]. 色谱, 2004, 22(1): 24-26. DOI:10.3321/j.issn:1000-8713.2004.01.006.